

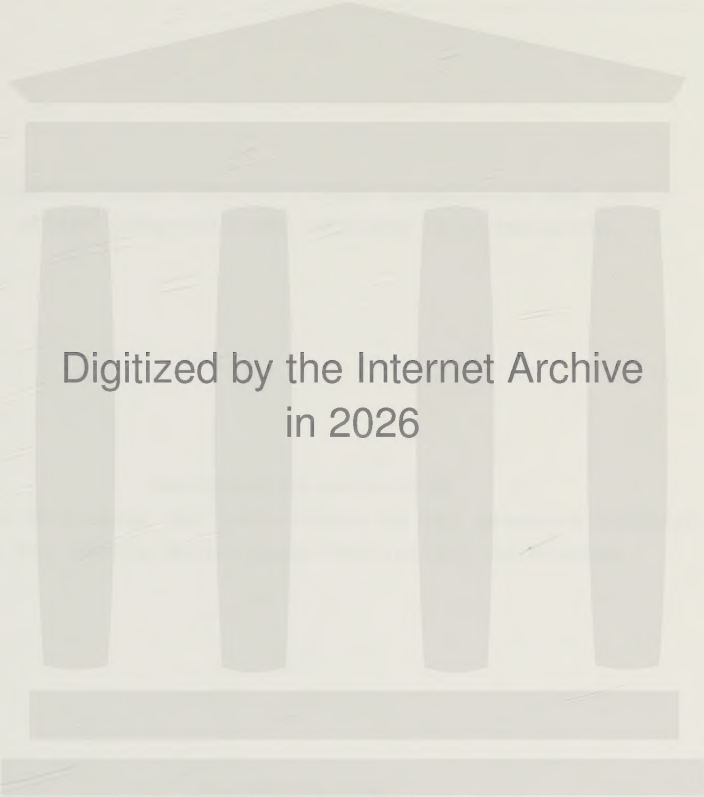
UNTERSUCHUNGEN HÄMOPHOETISCHER STAMMZELLEN
BEI DER AKUTEN LYMPHATISCHEN LEUKÄMIE
IM KINDESALTER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

Gaby Meyer

1980

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Hauner'schen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Betke

UNTERSUCHUNGEN HÄMOPOETISCHER STAMMZELLEN BEI DER
AKUTEN LYMPHATISCHEN LEUKÄMIE IM KINDESALTER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gaby Meyer
aus
Pirmasens
Jahr
1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R.J. Haas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 1981



Herrn Prof. Dr. med. R.J. Haas, Leiter der Abteilung
für Hämatologie und Onkologie der Universitäts-Kinder-
Klinik München, danke ich für die Überlassung des
Themas und die Förderung der Arbeit.

Herrn Dr. med. B. Netzel danke ich recht herzlich
für die stets lebenswürdige Betreuung und die Anregungen
zu dieser Arbeit.

INHALT

	Seite
I. Einleitung	1
II. Patienten, Material, Methode	5
III. Ergebnisse	11
IV. Diskussion	18
V. Zusammenfassung	22
VI. Literaturangaben	25

I. Einleitung

Die frühesten Ereignisse in der hämopoetischen Differenzierung, die zu den morphologisch gut definierten Zellen im Blut und im hämopoetischen Gewebe führen, sind immer noch unbekannt. Jedoch ließ sich aufgrund einer Fülle von experimentellen Untersuchungen in den letzten Jahren ein Modell der hämopoetischen Differenzierung entwickeln. Es geht aus von der Existenz pluripotenter Stammzellen, die die Fähigkeit zur Selbstreplikation und zur Ausdifferenzierung in die verschiedenen hämopoetischen Zellreihen besitzen (2, 3, 5, 18, 19, 26, 31, 34).

Da die Stammzellen morphologisch sich nicht erkennen lassen, wurden verschiedene Versuchssysteme entwickelt, von denen die in vivo Milzkolonietechnik, colony forming unit - spleen (CFU - S), am meisten Bedeutung erlangte (2). Bei dieser Technik sind 8 - 12 Tage nach Transfusion von Knochenmarkzellen in der Milz von letal bestrahlten Mäusen makroskopisch sichtbare Zellkolonien auffindbar. Die Milzkolonien bestehen aus Zellverbänden entweder der Erythropoese, der Myelopoese, der Megakaryopoese oder aus gemischten Kolonien aller 3 Zellreihen. Gemischte Kolonien, die aus einer einzigen CFU - S entstehen, sind ein Hinweis auf die Pluripotenz und die Anzahl der Kolonien ein Maß der Anzahl an transplantierten pluripotenten Stammzellen.

Aus der pluripotenten Stammzelle entsteht eine Tochtergeneration von ebenfalls nicht morphologisch definierbaren Zellen, den sogenannten determinierten Stammzellen oder Vorläuferzellen, die beschränkt sind in ihrem Differenzierungspotential auf 1 oder 2 Differenzierungsreihen und zudem durch spezifi-

sche humorale Faktoren reguliert werden (1, 6, 7, 9, 10, 15, 16, 20, 27, 28, 29).

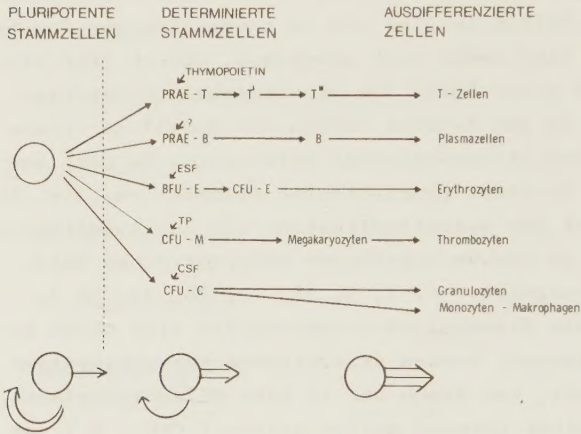


Abb. 1

Abkürzungen:

BFU - E Erythropoetisch determinierte Stammzelle
 CFU - E " " "
 CFU - M Vorläuferzelle der Megakaryozyten
 CFU - C Myeloisch determinierte Stammzelle
 ESF Erythropoetin
 TP Thrombopoetin
 CSF Kolonienstimulierender Faktor

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, ist das Erythropoetin ein Faktor, der auf die erythropoetisch determinierten Stammzellen wirkt und somit die Ausdifferenzierung in die Erythropoese einleitet. Genauso hat man für die Myelopoese einen regulierenden Faktor vermutet,

der durch Mangel eines geeigneten Testsystems nicht untersucht werden konnte. Erst die Entdeckung einer Technik für die Kultivierung hämopoetischer Zellen in einem soliden Agarmedium durch Plutznik und Sachs im Jahr 1956 (26) und durch Bradley und Metcalf im Jahr 1966 (5) erbrachte ein geeignetes in vitro System zur Untersuchung der myelopoetisch determinierten Stammzellen. Hierbei bilden sich unter dem Einfluß eines kolonienstimulierenden Faktors im Verlauf von 7 - 14 Tagen makroskopisch sichtbare Kolonien bestehend aus Granulozyten und Monozyten. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien, "colony forming units in culture" (CFU - C) ist ein Maß für die myeloisch determinierten Stammzellen, die sich in einer definierten Zahl von nukleären Knochenmarkszellen befinden (5, 26). Dieses System des indirekten Nachweises von Stammzellen mußte beim Menschen gewählt werden, da ein direkter Nachweis, wie es im Mäusesystem gelang, bisher nicht möglich ist. Obwohl sich die pluripotenten Stammzellen in manchen Eigenschaften von den determinierten Stammzellen unterscheiden lassen (Proliferationsrate, Dichte, Sedimentationsgeschwindigkeit und Radiosensivität), (12, 13, 19, 21, 22, 30, 33) ist es unter bestimmten Voraussetzungen und genau definierten experimentellen Bedingungen zulässig, mit Hilfe des CFU - C Testes quantitative Aussagen über den Gehalt an Stammzellen im Knochenmark und in der Zirkulation zu machen. Mittels der CFU - C Technik wurden folgende Fragestellungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeitet:

1. Untersuchungen über das Verteilungsmuster der normalen Resthämoese im Knochenmark und peripheren Blut zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

und vor Beginn der zytostatischen Therapie bei der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter.

2. Untersuchung der Stammzellspeicher im Knochenmark und peripheren Blut in der Remissionsphase, im Rezidiv, sowie kurz vor dem Rezidiv im Hinblick auf eine eventuelle Früherkennung des Rezidivs.
3. Verlaufsstudien während und nach der zytostatischen Erhaltungstherapie sollen Aufschluß geben über die Reaktionsmuster der normalen Stammzellspeicher. Unter genau definierten Therapieprotokollen sollen Längsschnittuntersuchungen zu den verschiedenen Zeitpunkten der hämopoetischen Regeneration Erkenntnisse über den Einfluß der Zytostatikatherapie auf die Stammzellkompartimente erbringen.

II. Patienten, Material und Methode

Die Untersuchungen wurden durchgeführt bei Kindern, die an akuter lymphatischer Leukämie erkrankt waren. Knochenmark oder Blut wurde bei den klinischen Routineabnahmen untersucht, und zwar bei Diagnosestellung vor Therapiebeginn, während der Induktionstherapie, im Verlauf der Erhaltungstherapie und nach Absetzen der Therapie. Eine Knochenmarkpunktion wurde routinemäßig in einem Intervall von 3 Monaten durchgeführt, periphere Blutabnahmen zum gleichen Zeitpunkt und zusätzlich in vierwöchigen Abständen. Knochenmark wurde den Patienten an der Spina iliaca superior posterior abgenommen. Unter Lokalanästhesie wurden jeweils 2 - 3 ml Knochenmarksblut aspiriert und mit 50 Einheiten stabilisatorfreiem Heparin pro ml Knochenmarksblut versetzt.

Die Behandlung erfolgte entweder nach dem Therapieprotokoll 75/76, welches Vincristin und Prednison in der Induktionsphase sowie ZNS - Bestrahlung mit 2400 rad innerhalb den ersten 10 Wochen beinhaltete, oder nach dem Protokoll 77-01, bestehend aus einer Induktion mit Vincristin, Prednison, Asparaginase und Adriamycin, einer Intensivphase, die sich zusammensetzt aus hochdosierter Gabe von Methotrexat als 24 - Stunden - Infusion, und dem COAP - Schema, bestehend aus Cyclophosphamid, Cytosin - Arabinosid, Vincristin und Prednison, anschließend eine prophylaktische ZNS - Bestrahlung mit 2400 rad plus Methotrexat intrathekal (11). Die Erhaltungstherapie bestand aus 6 - Mercaptopurin und Methotrexat für die Dauer von 30 Monaten bei beiden Therapieprotokollen.

Zur Definition einer Remission bzw. eines Rezidivs

wurden die international festgelegten Kriterien herangezogen, wonach ein Remissionsknochenmark weniger als 5 % leukämischer Blasten, ein Rezidiv über 5 % Blasten enthält.

Gewinnung und Separation lymphatischer Zellen aus Knochenmark und peripherem Blut.

Das Blut von Kontrollpersonen oder an Leukämie erkrankter Patienten wurde unter Zusatz von 50 Einheiten stabilisatorfreiem Heparin/ml Blut entnommen und in 25 ml Röhrchen auf eine äquivalente Menge Ficoll - Isopaque - Lösung geschichtet. Es wurde eine Ficoll - Isopaque - Lösung verwendet, wie sie von Boyum 1968 (4) beschrieben wurde (20,0 ml Isopaque - 75 % + 9,556 g Ficoll + 130,4 ml Aquadest; $d = 1.077$). Das Blut von Leukämiekindern mit hohen peripheren Zellzahlen wurde 1 : 1 mit RPMI 1640 Medium verdünnt und anschließend bei 1300 G für 15 min. zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten finden sich dann am Boden, während lymphoide Zellen an der Grenzfläche zwischen Medium und Ficoll - Isopaque aufgehalten werden. Die Lymphozyten und Stammzellen enthaltende Zwischenphase wurde vorsichtig abpipettiert und einmal bei 270 G und anschließend bei 180 G gewaschen. Vor der Verwendung der beschriebenen Zellsuspension wurde in einem Versuchsansatz die Vitalität der Zellen geprüft. Ein Teil Zellsuspension wurde mit einem Teil einer 5 % - igen Trypanblau - Lösung in physiologischer Kochsalzlösung vermischt. Bei phasenkontrastmikroskopischer Auswertung in einem Hämozytometer konnte der Prozentsatz der ungefärbten lebenden Zellen zu den blauen, toten Zellen bestimmt werden. Die Vitalität der untersuchten Zellprobe lag jeweils über 90 %.

In Vitroverfahren zur Kultur von menschlichen determinierten hämopoetischen Stammzellen.

Als ein geeignetes Indikatorsystem zum Nachweis hämopoetischer Stammzellen hat sich die CFU - C Technik erwiesen (Colony - forming - units in culture). Dieser in Vitrotest ermöglicht die Proliferation von myelopoetisch determinierten Stammzellen und erlaubt Aussagen über den quantitativen und qualitativen Bestandteil von hämopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark und im peripheren Blut.

Diese können nachgewiesen werden durch die Fähigkeit, in einer semisoliden Agarkultur zu Kolonien von reifen Granulozyten und Makrophagen auszuwachsen. Die Proliferation und Ausdifferenzierung dieser CFU - C erfordert das Vorhandensein eines spezifischen Glykoproteins, dem sog. Colony stimulating factor (CSF). Pike und Robinson 1970 adaptierten die Technik für das Wachstum humaner Stammzellen (25).

Der Colony stimulating factor wird hierbei in einer sog. feeder layer - Schicht, bestehend aus peripheren Leukozyten, gebildet. Die Colony forming cells (CFU - C) gehören zu einer morphologisch undifferenzierten Population, die determiniert ist zur Ausdifferenzierung in die myelomonozytäre Reihe. Unter den Kulturbedingungen im halbfesten Agar beginnen die determinierten Stammzellen des Knochenmarks zu proliferieren, und es entstehen Populationen von sich differenzierenden Zellen, verschiedener Reifungsstufen von Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen. Das die neuen Zellen aus einer einzelnen Stammzelle sich herleiten lassen, erkennt

man daran, daß sie einzelne Kolonien bilden. Die Kolonienausbeute pro Agarkulturschale nach 12 - 14 Tagen Kulturzeit ist proportional der in die Kultur gebrachten Anzahl von Stammzellen (19).

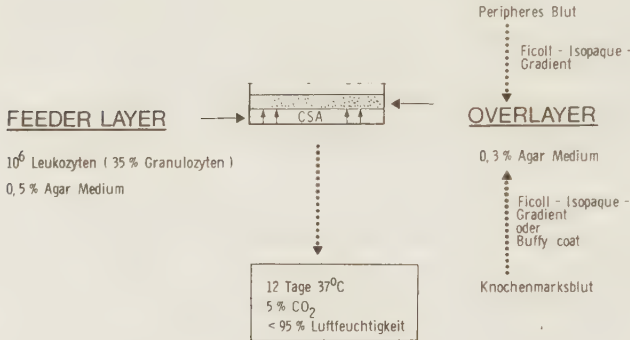


Abb. 2

Technik: 1 ml einer Mischung aus modifizierten Mc-Coy - Medium, 15 % eines selectierten fetalen Kälberserums, 0,5 % Agar und 10^6 Zellen, bestehend aus mononucleären Zellen des peripheren Blutes mit 35 % Granulozyten werden als feeder - layer auf dem Boden einer Petrischale (35 mm ϕ) ausgegossen (23). 10^5 oder 2×10^5 der Knochenmarkzellen werden in einer Lösung aus modifizierten Mc - Coy - Medium (25), 15 % fetalem Kälberserum und 0,3 % - igem Agar suspensiert und auf den feeder - layer pipetiert. Das Mischen der Knochenmarkzellen mit dem

Agar erfolgt bei 37°C in einem Wasserbad. Nach Erstarren der Agar - Zellsuspension bei Raumtemperatur werden sie in 12 - 14 Tagen bei 37°C in einer Atmosphäre mit 100 % Luftfeuchtigkeit in einem kontinuierlichen Strom von 5 % CO_2 kultiviert. Die nach dieser Zeit entstandenen Kolonien (CFU - C) werden in einem umgekehrten Mikroskop (Leitz - Diavert) gezählt, wobei eine Kolonie definiert ist als eine Einheit von mindestens 50 Zellen. Die Präparation der Zellsuspensionen, sowie Herstellung der Invitrokultursysteme wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Es wurden Knochenmarkzellen als 10^5 bzw. 2×10^5 und periphere Blutzellen als 10^6 mononucleäre Zellen kultiviert. Zur Umrechnung auf die Stammzellzahlen/ml aspiriertem Knochenmark bzw. /ml peripherem Blut wurden folgende Formeln angewendet:
 Stammzellen /ml Knochenmark : $\text{CFU} - \text{C}$ pro $10^5 \times$ kultivierte mononucleäre Knochenmarkszellen $\times$ Anzahl der mononucleären Zellen (in Millionen) dividiert durch ml Knochenmark $\times 0,1$.

Anzahl der Stammzellen im peripheren Blut = $\text{CFU} - \text{C}$ pro 10^6 mononucleäre Blutzellen $\times$ % mononucleäre Zellen $\times$ Anzahl der Leukozyten (in Tausend) dividiert durch hundert.

Alle Ergebnisse wurden gesichert mit Hilfe des Signifikanztestes von W.S. Gosset (t - Test, Pseudonym " student "). Die Signifikanzgrenzen werden entsprechend einer zweiseitigen Fragestellung gewählt. Differenzen von Mittelwerten verglichener Kollektive wurden als statistisch signifikant be-

wertet, wenn die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit einen Wert $p \leq 0,05$ ergab.

III. Ergebnisse

Bei Diagnosestellung der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter wurde vor Einleitung der zytostatischen Therapie bei 120 Patienten mit der CFU - C Technik das Verteilungsmuster der normalen Resthäthropoese untersucht. Unter den definierten Kulturbedingungen des CFU - C Testes findet nur ein klonales Wachstum von myeloisch determinierten Stammzellen statt. Dieser Test erfaßt also normale Vorläuferzellen und ist als Indikatorsystem für den quantitativen Nachweis normaler Resthäthropoese geeignet. Eine Proliferation von ALL - Zellen in diesem Kultursystem wurde nicht beobachtet und es ist bisher, mit Ausnahme der nur selten erfolgreichen Etablierung von Langzeit - Suspensionskulturen, nicht möglich, ALL - Zellen unter Kurzzeitkulturbedingungen zum Proliferieren zu bringen. Bei Diagnosestellung zeigen sich charakteristische Veränderungen der Stammzellenspeicher. Im Knochenmark findet man pro ml Aspirat häufig keine oder sehr wenig CFU - C. Wie aus Abb. 3 ersichtlich, ergab sich bei 68 Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose ein mittlerer CFU - C Wert von 1167 CFU - C pro ml Knochenmarksblut. Vergleichsweise findet man im Knochenmark gesunder Kinder eine CFU - C Anzahl von 15712 pro ml Knochenmarksblut ($n = 24$) und bei 157 Knochenmarksproben von Patienten in Remission einen Mittelwert von 6295 pro ml ($p < 0,001$).

Untersucht man das periphere Blut bei Kindern mit frischer ALL vor Therapie, so findet sich interessanterweise eine sehr hohe CFU - C Anzahl bei Diagnosestellung, nämlich 2666 CFU - C pro ml Blut,

untersucht bei 79 Patienten. Dieser Wert ist signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kindern, bei denen sich ein mittlerer Wert von 131 CFU - C pro ml findet ($n = 30$) $p < 0,001$. Wie aus Abb. 3 weiterhin ersichtlich, findet sich bei 141 Proben von Patienten in Remission im peripheren Blut ein mittlerer Wert von 11 CFU - C pro ml, somit ein signifikant erniedrigter Wert im Vergleich zu gesunden Kindern ($p < 0,001$).

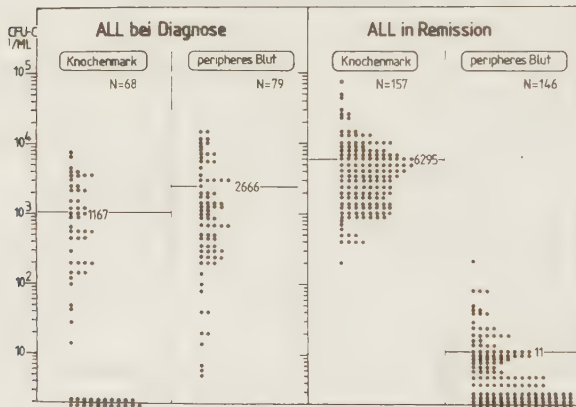


Abb. 3

Kontrollwerte von normalem Knochenmark:

15712 ± 10133 CFU - C/ml Knochenmarksblut

Bei Diagnose ist die überwiegende Mehrzahl der CFU - C in der Zirkulation und nicht im Knochenmark, welches bei Diagnosestellung in der Regel mit leukämischen Zellen durchsetzt ist. Von diesen Daten läßt sich ab-

schätzen, daß der Pool aller zirkulierenden Stammzellen vor der Chemotherapie größer ist als der gesamte Pool an Stammzellen im Remissionsknochenmark, welches der Erhaltungstherapie ausgesetzt ist. Zur besseren Veranschaulichung sind die Verhältnisse der CFU - C im peripheren Blut bei Diagnosestellung, in Remission und bei gesunden Kontrollpersonen nochmals gegenübergestellt.

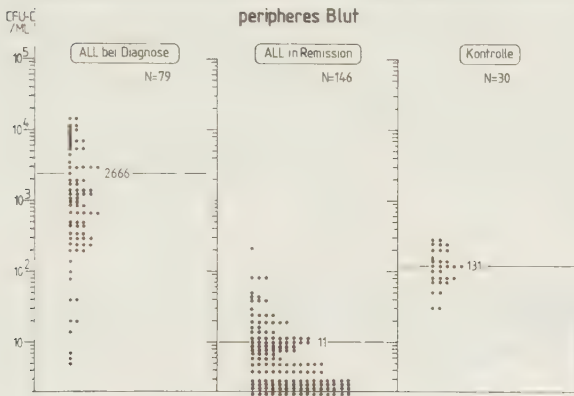


Abb. 4

Ein Teil der Patienten konnte zum Zeitpunkt des Rezidivs sowie 2 - 3 Monate vor Rezidiv untersucht werden (siehe Abb. 5). Im Knochenmarksaspirat konnte bei Patienten mit Rezidiv ein ähnlicher Befund wie bei Diagnosestellung gefunden werden. Die mittlere CFU - C Anzahl bei Patienten mit Rezidiv unterscheidet sich nicht signifikant von dem Wert bei Patienten bei Diagnosestellung (1362 CFU - C pro ml gegenüber 1165 CFU - C pro ml). Die CFU - C Anzahl im

Rezidiv ist gegenüber der Anzahl im Remissionsknochenmark signifikant erniedrigt ($p < 0,001$). Im peripheren Blut findet sich eine signifikant erhöhte Stammzellzahl bei Patienten im Rezidiv im Vergleich zu der CFU - C Anzahl bei Patienten in Remission ($p < 0,005$).

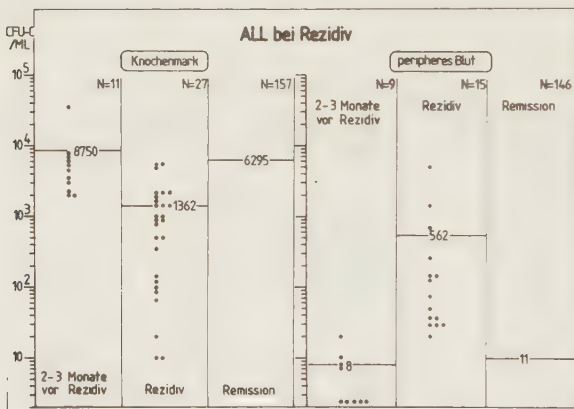


Abb. 5

Wie aus Abb. 5 weiterhin ersichtlich, konnten bei solchen Patienten auch Untersuchungen durchgeführt werden, die 2 - 3 Monate später an einem Rezidiv erkrankten. Die mittlere CFU - C Anzahl bei 11 Patienten im Knochenmark ergab einen Wert von 8750 CFU - C pro ml Knochenmarkaspirat, dieser Wert ist nicht signifikant unterschiedlich von Werten wie man sie während der Remissionsphase findet. Somit sind zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung keine Befunde erhältlich, die auf das Rezidiv hinweisen könn-

ten. Im peripheren Blut finden sich 2 - 3 Monate vor dem Rezidiv im Mittel bei 9 Patienten 8 CFU - C pro ml, dies entspricht etwa den Verhältnissen wie man sie bei Patienten in Remission unter Erhaltungstherapie findet (11 CFU - C pro ml). Es sind also zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung auch im peripheren Blut keine Hinweise auf eine mögliche Früherkennung des Rezidivs gegeben.

Die Veränderungen der Stammzellspeicher im Verlauf der Remission wurde bei 2 Patientenkollektiven untersucht, die unterschiedlich therapiert worden waren. Das Ausmaß der Regeneration der normalen Hämapoese läßt sich anhand der peripheren Blutwerte nicht allein ausreichend beurteilen. Es wurde deshalb der Grad der Restitution der myeloisch determinierten Stammzellkompartimente im Knochenmark selbst bestimmt.

Die Ergebnisse von Längsschnittuntersuchungen bei Patienten, die nach dem Therapieprotokoll 75/76 behandelt worden waren, sind in Abb. 6 zusammengefaßt.

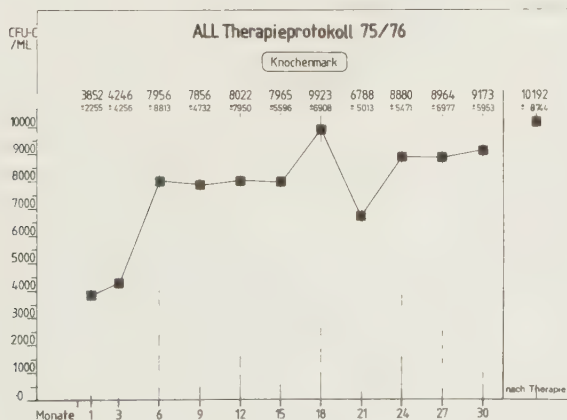


Abb. 6

Es wurde im Abstand von 3 Monaten bei den Patienten Knochenmark entnommen und auf den CFU - C Gehalt untersucht. In vereinzelten Fällen konnten auch Untersuchungen bei solchen Patienten durchgeführt werden, die von der Therapie bereits abgesetzt waren und bis zu 28 Monate ohne Therapie waren. Signifikant erniedrigte CFU - C Werte pro ml Knochenmark wurden ein und drei Monate nach Induktionstherapie beobachtet. Eine Konsolidierung des myeloisch determinierten Stammzellspeichers konnte in den folgenden Monaten beobachtet werden. Hier unterschieden sich die Werte zwischen 6 Monaten und in 3 monatigen Abständen bis zu 30 Monaten nicht signifikant. Es konnte auch kein signifikanter Unterschied gefunden werden zwischen jenen Patienten, die nach Absetzen der Therapie untersucht worden waren und solchen, die 6 Monate oder später nach Beginn der Induktionstherapie untersucht worden waren.

Die Ergebnisse von Patienten, die nach dem Chemotherapieprotokoll 77-01 behandelt worden waren, sind in Abb. 7 zusammengefaßt.

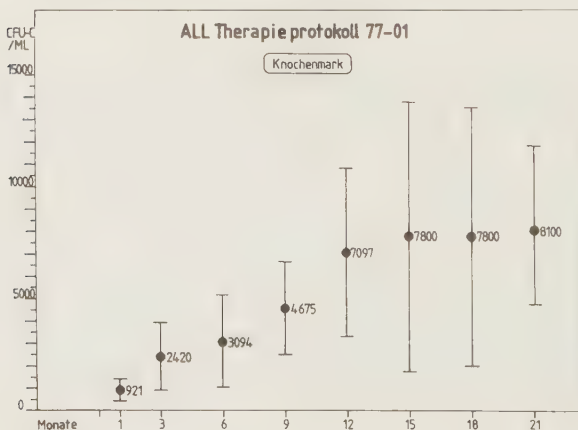


Abb. 7

Es zeigt sich deutlich, daß dieses Therapieschema den Stammzellpool wesentlich stärker reduziert als das Therapieschema 75/76. Es sind in den ersten 3 Monaten signifikant weniger CFU - C pro ml Knochenmarksblut zu finden als im Protokoll 75/76. Weiterhin wird daraus ersichtlich, daß in den folgenden 6 Monaten eine verzögerte Regeneration des Knochenmarkstammzellpools stattfindet. In dem weiteren Beobachtungszeitraum 12 Monate bis 21 Monate nach Beginn der Induktionstherapie unterscheiden sich beide Therapieprotokolle nicht hinsichtlich der gefundenen CFU - C Anzahl pro ml Knochenmark.

IV. Diskussion

Erkenntnisse über die Reaktionsmuster menschlicher CFU - C nach Zytostatikagaben beschränken sich bisher auf Dosiswirkungskurven im Verlauf der Induktionstherapie bei verschiedenen menschlichen Tumoren, sowie auf Untersuchungen während der hämopoetischen Regeneration nach wiederholter Zytostatikagabe (17). Genaue Untersuchungen der hämopoetischen Stammzellspeicher bei der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter lagen bisher nicht vor, ebenso wenig wurde der Frage nach möglichen Dauerschäden der Hämoese nach Langzeittherapie nachgegangen. Mit den vorliegenden Untersuchungen konnten Einblicke gewonnen werden, einmal über die Verteilungsmuster der determinierten Stammzellen bei Diagnosestellung der Erkrankung vor Einleitung der Chemotherapie, weiterhin bei Patienten, die an einem Rezidiv erkrankten, und schließlich bei Patienten während der Erhaltungstherapie bzw. nach Absetzen der Chemotherapie.

Mit den angewendeten Kulturverfahren findet ein Wachstum der leukämischen Zellpopulation in vitro nicht statt, (14) während die Proliferation normaler hämopoetischer Vorläuferzellen stattfindet und das Testsystem für den quantitativen Nachweis myeloisch determinierter Stammzellen geeignet ist (19, 25).

Bei Diagnosestellung der akuten lymphatischen Leukämie vor Einleitung der zytostatischen Therapie konnten charakteristische Veränderungen der Stammzellkompartimente im Knochenmark und peripheren Blut

gefunden werden. Im Knochenmark ließen sich entweder keine oder sehr stark erniedrigte CFU - C Werte finden. Eine mögliche Erklärung für den geringen Anteil an CFU - C im Knochenmark bei Diagnosestellung könnte darin gesehen werden, daß die leukämische Population durch Interaktion mit dem Stammzellpool einen Differenzierungsstop im Knochenmark bewirkt (32).

Vorläufige eigene Untersuchungen, in denen mit Hilfe von Co - Kulturen aus normalen Knochenmarkzellen und leukämischen Zellen diese Interaktion untersucht werden konnte, sprechen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Autoren (8) nicht für diesen Wirkungsmechanismus. Weitaus wahrscheinlicher scheint uns die Erklärung, daß die Expansion der leukämischen Blasten im Knochenmark eine Verdrängung der normalen Hätopoese bewirkt und die normalen Stammzellen, die als mobile Einheiten anzusehen sind, ins periphere Blut emigrieren. Eine ausreichende Ausreifung und Differenzierung der Stammzellen in die myeloische Reihe scheint dann nicht mehr stattzufinden, dies ist auch in Übereinstimmung mit der klinischen Beobachtung, der Granulozytopenie, welche regelmäßig bei der akuten lymphatischen Leukämie anzutreffen ist. Die Emigration der Stammzellen in die Zirkulation ließ sich bei unseren Untersuchungen bestätigen. Bei Diagnosestellung sind im peripheren Blut durchschnittlich 200mal mehr CFU - C pro ml Blut zu finden als bei gesunden Kindern. In einer ganzen Reihe von untersuchten Kindern konnten CFU - C Zahlen im peripheren Blut gefunden werden, wie sie normalerweise nur im Knochenmark von gesunden Kindern zu finden sind.

Patienten, die zum Zeitpunkt des Rezidivs untersucht worden waren, zeigen Verteilungsmuster an CFU - C im Knochenmark und peripheren Blut, wie sie bei Diagnosestellung gefunden worden waren, nämlich eine stark erniedrigte CFU - C Zahl im Knochenmark und deutlich erhöhte Werte im peripheren Blut. In dieser Phase der Erkrankung kommt es offensichtlich zu denselben Mechanismen, wie sie bei Patienten mit frischer Erkrankung beschrieben werden konnten. Von besonderer Bedeutung war für uns die Frage nach einer eventuellen Früherkennung eines Rezidivs mit Hilfe der CFU - C Technik. Patienten, die 2 - 3 Monate vor Erkennen eines Rezidivs untersucht worden waren, zeigten jedoch keine charakteristischen Veränderungen wie sie sich zum Zeitpunkt des Rezidivs feststellen lassen. Ein Ansteigen der CFU - C im peripheren Blut war zeitlich nicht zu trennen von den Beobachtungen der hämatologischen Routineuntersuchungen, die ein Absinken der Thrombozyten und sowie Granulozyten im peripheren Blut beim Rezidiv anzeigten.

Die Längsschnittuntersuchungen, die während der zytostatischen Erhaltungstherapie durchgeführt wurden, sollten einen Einblick ermöglichen in die quantitativen Veränderungen der determinierten Stammzellspeicher. Das Verständnis dieser Parameter ist wiederum bedeutend für eine Knochenmarkentnahme in der Remissionsphase im Rahmen der autologen Knochenmarktransplantation (24).

Es ließ sich zeigen, daß bei den verschiedenen Therapieprotokollen im Laufe der Induktionstherapie der Stammzellpool stark reduziert ist, bei dem Therapieprotokoll 75/76 konnte erst 6 Monate nach Therapiebeginn eine Konsolidierung gefunden werden. Eine wesentlich verzögerte Regeneration des Knochenmarkstammzellpools war bei dem Therapieprotokoll 77/01 festzustellen, welches eine wesentlich aggressivere Induktionstherapie beinhaltet. Eine vergleichbare Erholung des Stammzellspeichers bei Patienten, die nach dem Protokoll 77/01 behandelt worden waren, ließ sich erst mit einer Verzögerung von 6 Monaten finden. Im weiteren Verlauf der Erhaltungstherapie unterschieden sich jedoch beide Protokolle nicht hinsichtlich der gemessenen Stammzellspeicher.

Ein Vergleich mit den CFU - C Werten im Knochenmark gesunder Kinder zeigt, daß selbst nach Absetzen der zytostatischen Erhaltungstherapie über viele Monate ein reduzierter Stammzellpool sich nachweisen läßt. Indirekt läßt sich daraus schließen, daß der Pool der pluripotenten Stammzellen im Knochenmark durch die zytostatische Therapie erheblich beeinträchtigt worden war und es nur zu einer sehr langsamen Erholung dieses Speichers, entsprechend auch des nachgeschalteten Speichers der determinierten Stammzellen kommt. Die Erkenntnis dieser Parameter ist schließlich auch von Bedeutung für das Verständnis der therapieinduzierten Aplasie, die bei aggressiverer Chemotherapie in der Behandlung der ALL zu einem limitierenden Faktor werden kann.

Zusammenfassung

Die vorgelegten Untersuchungen hatten zum Ziel, Erkenntnisse über die Verteilungsmuster normaler hämopoetischer Stammzellen bei der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter zu gewinnen. Weiterhin sollte anhand von Längsschnittuntersuchungen das Ausmaß der Degeneration und Regeneration hämopoetischer Stammzellen im Verlauf unterschiedlicher Therapien untersucht werden. Da sich die Stammzellen des hämopoetischen Gewebes morphologisch nicht zu erkennen geben, wurde ein in vitro Kulturverfahren angewendet, bei welchem die Proliferation und Differenzierung einzelner Stammzellen in die myelo - monozytäre Reihe durch das klonale Wachstum zu Zellkolonien (CFU - C) nachgewiesen wird. Die wesentlichen Ergebnisse sind nachfolgend zusammengefaßt:

1. Bei Diagnosestellung und vor Beginn der zytostatischen Therapie wurden bei 120 Patienten die Verteilungsmuster myeloisch determinierter Stammzellen (CFU - C) im Knochenmark und peripheren Blut untersucht. Im Knochenmark ist die CFU - C Anzahl pro ml Aspirat stark erniedrigt, man findet entweder keine oder nur wenig CFU - C, im Mittel 1167 pro ml Knochenmarksblut, vergleichsweise findet man bei Kindern ohne Erkrankung des hämopoetischen Systems eine mittlere Anzahl von 15712 CFU - C pro ml Knochenmarksblut. Zur gleichen Zeit findet man im peripheren Blut der Patienten eine sehr hohe Anzahl von CFU - C, im Mittel 2666 pro ml Blut. Dieser Wert ist etwa 200 mal höher im Vergleich zu ge-

sunden Kindern (131 CFU - C pro ml Blut). Die Expansion leukämischer Zellen im Knochenmark führt somit zu einer Verdrängung der normalen Hämpoese und bewirkt, daß die Stammzellen, welche als mobile Einheiten anzusehen sind, ins periphere Blut emigrieren.

2. Patienten, die zum Zeitpunkt eines hämatologischen Rezidivs untersucht wurden, zeigten ähnliche Verteilungsmuster an CFU - C im Knochenmark und peripheren Blut, wie sie bei Erstdiagnose festgestellt werden konnten, insbesondere hohe CFU - C Werte im peripheren Blut. Dagegen war bei Patienten, die 2 - 3 Monate vor Erkennen eines hämatologischen Rezidivs untersucht wurden, dieser Trend noch nicht erkennbar. Das Ansteigen der CFU - C Werte im peripheren Blut über Normwerte war zeitlich nicht zu trennen von den Beobachtungen der klinischen Routinediagnostik, die ein Abfallen der Thrombozyten und Granulozyten im peripheren Blut beim Rezidiv anzeigten.
3. Untersuchungen über quantitative Veränderungen der myeloischen Stammzellspeicher konnten in Abständen von jeweils 3 Monaten während der 30 Monate dauernden Erhaltungstherapie sowie nach Absetzen der Therapie durchgeführt werden. Eine deutliche Reduzierung des CFU - C Pools im Knochenmark fand sich ein und zwar 3 Monate nach Beginn der Induktionstherapie bei Patienten, die nach dem Protokoll 75/76 behandelt wurden. Eine Konsolidierung des Stammzellpools wurde in den folgenden Monaten beobachtet, jedoch blieb der CFU - C Pool im Vergleich zu normalem Knochenmark signifikant erniedrigt. Wesentlich stärker

reduziert war der CFU - C Pool in den ersten 3 Monaten bei Patienten, die nach dem Protokoll 77/01 behandelt wurden. Es war in den folgenden 6 Monaten eine erheblich verzögerte Regeneration des CFU - C Pools im Knochenmark festzustellen. Vergleiche mit CFU - C Daten von Knochenmark von Patienten ohne Erkrankung des hämopoetischen Systems zeigten, daß selbst nach Absetzen der zytostatischen Erhaltungstherapie über viele Monate hinweg ein reduzierter Stammzellpool sich nachweisen läßt.

Literatur

- 1) Alpen E.L., Cranmore D.: Observations on the regulation of erythropoiesis and on cellular dynamics by Fe⁵⁹ autoradiography.
In: The kinetics of cellular proliferation.
Edited by F. Stohlman, Jr., New York, Grune and Stratton, 290, 1959.
- 2) Barnes DWH, Loutit JF: Haemopoietic stem cells in the peripheral blood.
In: Lancet 2, 1138-1141, 1967.
- 3) Becker AJ, McCulloch EA, Till JE: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.
In: Nature 197, 452-455, 1963.
- 4) Bøyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow.
In: Scand J clin Lab. Invest 21, 1, 1968.
- 5) Bradley TR, Metcalf D: The growth of mouse bone marrow cells in vitro.
In: Aust J Exp Biol Med Sci 44, 287-300, 1966.
- 6) Erslev A.J.: The effect of Anemic Anoxia on the Cellular Development of Nucleated Red Cells.
In: Blood 14, 386, 1959.
- 7) Filmanowicz E., Gurney C.W.: Studies on Erythropoiesis. Response to a single dose of Erythropoietin in polycythemic mouse.
In: J. Lab. Clin. Med. 57, 65, 1961.
- 8) Findley H.W., Kennedy M.S., Lui V.K-S., Ragab A.H.: The effect of leukemic lymphoblasts on normal granulopoiesis.
In: Exp.Hemat.7, 495, 1979.
- 9) Gregory C.J.: Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture.
In: Cell.Physiol. 89, 289, 1976.

- 10) Gregory C.J., McCulloch E.A., Till J.E.:
Erythropoietic progenitors capable of colony
formation in culture: State of differentiation.
In: J. Cell. Physiol. 81, 411, 1973.
- 11) Haas R.J., Netzel B., Janka G.E., Rodt H.,
Thiel E., Thierfelder S.: Diagnostischer Ein-
satz spezifischer Antiseren bei der akuten
lymphatischen Leukämie im Kindesalter.
In: Klin. Pädiat. 191, 446, 1978.
- 12) Haskill J.S., Moore M.A.S.: Two dimensional
cell separation: comparison of embryonic and
adult haemopoietic stem cells.
In: Nature 226, 853, 1970.
- 13) Haskill H.S., McNeill T.A., Moore M.A.S.:
Density distribution analysis of in vivo and
in vitro colony forming cells in bone marrow.
In: J. Cell. Physiol. 75, 167, 1969.
- 14) Hoelzer D., Kurrle E., Schmücker H., Harriss
E.B.: Evidence for differentiation of human
leukemic blood cells in diffusion chamber
culture.
In: Blood 49, 729, 1977.
- 15) Iscove N.N., Sieber F., Winterhalter K.H.:
Erythroid colony formation in cultures of mouse
and human bone marrow: Analysis of the require-
ment for erythropoietin by gel filtration and
affinity chromatography on agarose-concanavalin A.
In: J. Cell. Physiol. 83, 309, 1974.
- 16) Jacobson L.O., Goldwasser E., Gurney L.W.:
Transfusion-induced polycythaemia as a model
for studying factors influencing erythropoiesis.
In: CIBA Symposium in haemopoiesis: cell pro-
duction and its regulation. Edited by G.E.W.
Wolstenholme and M.O'Connor.
London, Churchill, 423, 1960.
- 17) Marsh I.C.: The effect of cancer chemothera-
peutic agents on normal hematopoietic precursor
cells: a review.
In Cancer Res. 36, 1853, 1976.

- 18) McCulloch E.A., Till J.E.: The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma radiation in vitro and in vivo.
In: Radiat. Res. 16, 822, 1962.
- 19) Metcalf D., Moore M.A.S.: Haemopoietic stem cells and progenitor cells.
In: Haemopoietic Cells, 70, 1971. North-Holland Publishing Company Amsterdam, London.
- 20) Metcalf D., Moore M.A.S.: Humoral regulation of haemopoiesis.
In: Haemopoietic Cells, 362, 1971. North-Holland Publishing Company Amsterdam, London.
- 21) Metcalf D., Moore M.A.S., Shortman K.: Adherence column and buoyant density separation of bone marrow stem cells and more differentiated cells.
In: J. Cell. Physiol. 78, 441, 1971.
- 22) Moore M.A.S., McNeill T.A., Haskill J.S.: Density distribution analysis of in vivo and in vitro colony forming cells in developing fetal liver.
In: J. Cell. Physiol. 75, 181, 1970.
- 23) Netzel B., Rodt H., Hoffmann-Fezer G., Thiel E., Thierfelder S.: The effect of crude and differently absorbed anti-human T-cell globulin on granulocytic and erythropoietic colony formation.
In: Exp. Hemat. 6, 410, 1978.
- 24) Netzel B., Haas R.J., Rodt H., Kolb H.J., Thierfelder S., Betke K.: Antileukemic, autologous bone marrow transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia.
In: Eur. J. Pediatr. 25, 133, 1980.
- 25) Pike B.L., Robinson W.A.: Human bone marrow colony growth in agar-gel.
In: J. Cell. Physiol. 76, 77, 1970.
- 26) Pluznik D.H., Sachs L.: The cloning of normal "mast" cells in tissue culture.
In: J. Cell. Comp. Physiol. 66, 319, 1965.

- 27) Prchal J.F., Adamson J.W., Steinmann L., Fialkow P.J.: Human erythroid colony formation in vitro: evidence for clonal origin.
In: J. Cell. Physiol. 89, 489, 1976.
- 28) Stephenson J.R., Axelrad A.A., McLead D.L., Shreeve M.M.: Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro.
In: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 7, 1542, 1971.
- 29) Teppermann A.D., Curtis J.E., McCulloch E.A.: Erythropoietic colonies in culture of human marrow.
In: Blood 44, 659, 1974.
- 30) Testa N.G., Lajtha L.G.: Comparison of the Kinetics of colony forming units in spleen (CFUs) and culture (CFUc).
In: Brit. J. Haematol. 24, 367, 1973.
- 31) Till J.E., McCulloch E.A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.
In: Radiat. Res. 14, 213, 1961.
- 32) Van Bekkum D.W., Van Oosterom P., Dicke K.A.: In vitro colony formation of transplantable rat leukemias in comparison with human acute myeloid leukemia.
In: Cancer Res. 36, 941, 1976.
- 33) Worton R.G., McCulloch E.A., Till J.E.: Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture.
In: J. Cell. Physiol. 74, 171, 1969.
- 34) Wu A.M., Till J.E., Siminovitch L, et al: A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells.
In: J. Cell. Physiol. 69, 177, 1967.

Lebenslauf

- 22.3.1955 geboren in Pirmasens, Rheinland-Pfalz,
als drittes Kind des Kaufmanns Raymond
Meyer und seiner Ehefrau Else, geb.
Rothhaar.
- 1961-65 Volksschule in Pirmasens
- 1965-73 Staatl. Neusprachl. Gymnasium in
Pirmasens
- 1973 Abitur
- 1974 Beginn des Medizinstudiums in München
an der Ludwig-Maximilians-Universität
- 1976 1. Vorärztliche Prüfung (Physikum)
- 1977 1. Ärztliche Prüfung
- 1978 Beginn meiner Doktorarbeit im hämato-
logisch-onkologischen Forschungslabor
der Kinderklinik der Universität München
- 1979 2. Ärztliche Prüfung
- 1979-80 Praktisches Jahr in München:
1. Tertial im Schwabinger Krankenhaus
(Chirurgie),
2. Tertial in der Kinderklinik der
Universität München (Pädiatrie),
3. Tertial im Klinikum Großhadern
III. Med. (Innere Medizin)
- 21.11.1980 3. Ärztliche Prüfung
- 24.11.1980 Approbation als Arzt

